



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0025133
(43) 공개일자 2024년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) A61K 35/39 (2015.01)
A61P 3/10 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0676 (2013.01)
A61K 35/39 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0102968
(22) 출원일자 2022년08월17일
심사청구일자 2022년08월17일

(71) 출원인
포항공과대학교 산학협력단
경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
김동성
경상북도 포항시 남구 청암로 77,
포항공과대학교(지곡동)
이성진
경상북도 포항시 남구 청암로 77,
포항공과대학교(지곡동)
(74) 대리인
특허법인 이룸리온

전체 청구항 수 : 총 14 항

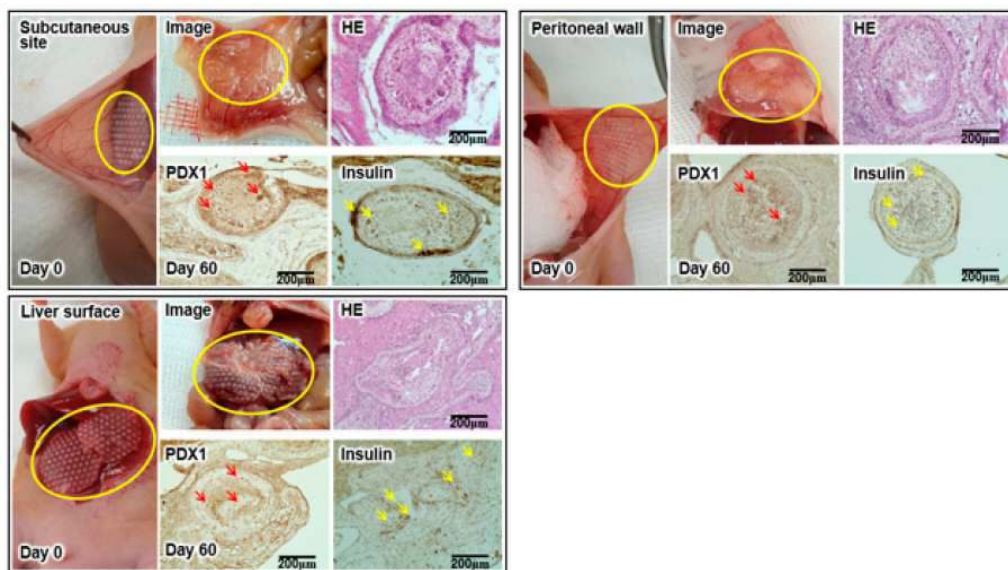
(54) 발명의 명칭 줄기세포 유래 인슐린 분비 세포 응집체를 담지한 생분해성 다공성 마이크로젤을 포함하는 세포이식체 내지 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 줄기세포 유래 인슐린 분비 세포 응집체를 포함하고 이식 가능한 당뇨병 세포치료제용 조성물에 대한 것이다.

본 발명은 전기방사 투과성인 생분해성 폴리카프로락톤(PCL) NF 멤브레인에 정형 공정을 사용하여 NF 마이크로젤 어레이 멤브레인을 제작했기 때문에 가스 및 용해성 인자를 투과시킬 수 있었다. 본 발명의 NF 마이크로젤은 일반적인 불투과성 PDMS 마이크로젤보다 iPSC 응집체에 더 많은 영양소를 제공할 수 있으며, 세포의 생존 및 분화 기능을 향상시킬 수 있었다. 또한, NF 막은 고정 물질 없이 피하 및 간 및 복막과 같은 장기 표면에 별도의 봉합 없이 단독으로 부착되어 주변 조직과 통합되어 PDMS 마이크로젤보다 더 높은 인슐린 분비를 나타냈다. 따라서, 본 발명은 당뇨병 예방 또는 치료용 조성물로서 효과적으로 활용될 수 있다.

대표도 - 도7b



(52) CPC특허분류

A61P 3/10 (2018.01)
C12N 5/0075 (2013.01)
C12N 2506/02 (2013.01)
C12N 2506/03 (2013.01)
C12N 2506/45 (2013.01)
C12N 2533/40 (2013.01)
C12N 2535/00 (2013.01)

(72) 발명자

김송철

서울특별시 송파구 올림픽로 435 , 221동 2002호
 (신천동, 파크리오)

윤재승

경상북도 포항시 남구 청암로 77, 포항공과대학교
 (지곡동)

김도희

경상북도 포항시 남구 청암로 77, 포항공과대학교
 (지곡동)

심인경

서울특별시 송파구 올림픽로 135, 215동 1104호(잠
 실동, 리센즈)

이유나

전라북도 익산시 부송1로 83, 104동 808호(부송동,
 동신아파트)

엄정수

경상북도 포항시 남구 청암로 77, 포항공과대학교
 (지곡동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711126720
과제번호	2019M3A9H1103769
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발(R&D)
연구과제명	역분화줄기세포 유래 신장 오가노이드 성숙화를 위한 물질교환/전단력 자극 복합 미
세환경 구현 플랫폼 개발 및	약물의 신장 독성/유효성 평가와 질환 모델 구축
기 여 율	50/100
과제수행기관명	포항공과대학교
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415180884
과제번호	20012378
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가관리원
연구사업명	산업기술알키미스트프로젝트사업
연구과제명	메타 소프트웨어간모듈 제작 기술 및 모듈 어셈블리 로봇 시스템 개발
기 여 율	50/100
과제수행기관명	포항공과대학교산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

다공성 마이크로웰 어레이에 줄기세포 또는 전구세포(progenitor cell)를 시딩하여 배양하는 단계; 를 포함하는 인슐린 분비세포 응집체로의 분화 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 유도 만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell), 배아줄기세포(embryonic stem cell) 또는 성체 줄기세포(adult stem cell) 인 것을 특징으로 하는 분화 방법.

청구항 3

제1항에 있어서 상기 다공성 마이크로웰은 입구 직경이 400 ~ 1,000 μm 이고, 깊이가 120 ~ 900 μm 인 것을 특징으로 하는 분화 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서 상기 다공성 마이크로웰의 기공 크기는 0.01 ~ 10 μm 이고, 공극률은 3 % ~ 25 % 인 것을 특징으로 하는 분화 방법.

청구항 5

제1항에 있어서 상기 다공성 마이크로웰의 용해성 인자에 대한 물질 투과성은 1×10^{-7} cm/s ~ 1×10^{-5} cm/s 인 것을 특징으로 하는 분화 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 용해성 인자는 포도당(glucose), ROCK 억제제, 액티빈 A(activin A), GSK-3 억제제, 도르소모르핀(dorsomorphin), 레티노산(retinoic acid), ALK5 억제제, SANT-1, 인슐린 및 성장인자 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 분화 방법.

청구항 7

제1항에 있어서 상기 다공성 마이크로웰은 100 nm ~ 2,000 nm 직경의 생분해성고분자 나노섬유로 구성된 것을 특징으로 하는 분화 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 분화 방법은

i) 상기 시딩된 줄기세포 또는 전구세포를 내배엽(definitive endoderm) 세포로 유도하는 단계;

- ii) 상기 유도된 내배엽 세포를 췌장 전구세포(pancreatic progenitor cell)로 유도하는 단계; 및
 - iii) 상기 유도된 췌장 전구 세포를 인슐린 생산 세포로 유도하는 단계;
- 를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 분화 방법.

청구항 9

제1항의 분화방법으로 분화된 줄기세포 또는 전구세포(progenitor cell) 유래 인슐린 분비 세포 응집체.

청구항 10

제1항의 분화방법으로 분화된 줄기세포 또는 전구세포(progenitor cell) 유래 인슐린 분비 세포 응집체를 담지한 다공성 마이크로웰을 포함하는 세포이식체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 다공성 마이크로웰은 생분해성 다공성 마이크로웰인 것을 특징으로 하는 세포이식체.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 생분해성 다공성 마이크로웰은 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL), PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)), PGA(poly(glycolic acid)) 및 PLA(poly(lactic acid)) 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 세포이식체.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 세포이식체는 당뇨병 치료용인 것을 특징으로 하는 세포이식체.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 세포이식체는 단독으로 부착하여 이식 가능한 것을 특징으로 하는 세포이식체.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 다공성 마이크로웰 어레이에 줄기세포를 시딩하여 배양 및 분화된 인슐린 분비세포 응집체 내지 상기 인슐린 분비세포 응집체를 담지한 생분해성의 다공성 마이크로웰을 포함하는 당뇨병 치료용 세포이식체에 대한 것이다.

배경 기술

[0003]

당뇨병은 심장병, 신부전, 뇌졸중, 당뇨병성 신경병증과 같은 다양한 전신 합병증의 원인이 되고 수명도 단축되어 전 세계적으로 막대한 의료비 지출을 초래한다. 인슐린 의존성 당뇨병에서 외인성 인슐린 주사는 고혈당을 줄이기 위한 표준 치료법이다. 그러나 일반 인슐린 주사는 심각한 저혈당을 유발할 수 있고 건강한 췌장에서 제공하는 것과 같은 정확한 혈당 조절을 허용하지 않기 때문에 장기적인 합병증을 예방할 수 없다. 당뇨병의 합병증을 예방하기 위해서는 혈당에 맞춘 정확한 실시간 당뇨병 관리가 중요하다. 따라서 췌장과 췌도 이식은 당뇨병의 잠재적인 치료 방법이다.

- [0004] 췌장(pancreas) 이식과 달리 췌도(pancreatic islet) 이식은 비교적 간단하고 비침습적이다. 2000년에 Edmonton 그룹은 췌도 이식 후 1년 후에 성공적으로 인슐린 비의존 상태가 된 7명의 환자를 보고했다. 그러나 이들 중 20%만이 5년까지 인슐린 비의존성을 유지했고 나머지 80%는 다시 인슐린 주사가 필요했다. 췌도 이식이 이상적인 치료법이지만 표준 치료법이 되기까지는 기증자 부족과 이식 후 섬(islet)의 낮은 생착 효능 등 넘어야 할 산이 많다.
- [0005] 이전에는 이식된 섬을 사체 기증자에게서만 얻을 수 있었다. 최근 줄기세포 및 분자생물학의 기술 발전으로 줄기세포로부터 분화된 인슐린 생산 세포가 섬의 대체 공급원으로 개발되고 있다. 그러나 그들은 자연 섬과 달리 낮은 생리 기능으로 인해 생체 내에서 여전히 제한된 포도당 조절을 나타낸다. 섬의 세포-세포 응집 구조는 생리학적 기능을 유지하는데 필수적이라는 것은 잘 알려져 있다. 따라서 분화된 섬에 대한 다양한 연구가 천연 섬의 형태학적 특성을 모방하여 인슐린 생성 기능을 향상시키려는 시도가 이루어지고 있다. 수많은 접근법 중에서 분화된 섬을 3D 구조로 집게하는 것은 인슐린 생성 기능을 향상시키는 데 상당한 영향을 미치는 것으로 나타났으며 분화된 섬의 집계를 생성하기 위해 여러 접근법이 개발되었다. 최근 마이크로웰 어레이는 원하는 크기의 응집체를 쉽고 빠르게 생성할 수 있는 방법을 제공하는 것으로 강조되었다. 그러나, 기존의 마이크로웰은 상부 표면을 제외하고는 불투과성 물질로 만들어지기 때문에 영양분 및 산소 공급이 제한된다. 마이크로웰 어레이에서 제한된 영양소와 산소 공급은 잠재적으로 줄기 세포가 췌도로 분화하는 과정을 방해하거나 분화된 섬의 인슐린 생산 기능을 손상시킬 수 있다.
- [0006] 현재 임상에서 췌도는 당뇨병 환자의 간 아래 혈관(문맥정맥)에 이식된다. 간문맥을 통한 섬 주입은 즉각적인 혈액 매개 염증 반응과 섬 세포의 세포자멸사를 유발한다. 또한 문맥주사 시 문맥고혈압, 출혈, 혈전증이 나타날 수 있어 심각한 합병증을 유발할 수 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 피하 부위나 간 표면, 복막, 망막 등의 대체 이식 부위가 다수 제안되었다. 마이크로웰 어레이는 이식할 수 없기 때문에 분화된 섬은 먼저 마이크로웰 어레이에서 수확해야 한다. 그러나 스캐폴드가 없는 이식된 섬은 환자의 조직에서 빠르게 휩쓸리거나 빠르게 분해되어 이식 효능이 낮다. 이와 관련하여 이식 가능한 스캐폴드는 이식 후 섬의 3차원 구조를 유지하는 데 도움이 되는 이식 효능을 향상시키기 위해 자주 활용된다. 최근에는 세포 시트 공학, 3D 바이오프린팅, 기능성 하이드로겔 또는 폴리머 제조와 같은 조직 공학 기술을 기반으로 기능성 및 이식 가능한 스캐폴드가 개발되고 있다.
- [0007] 시트나 멤브레인을 직접 이식하여 다양한 장기의 표면에 부착할 수 있다. 전기방사는 전하를 이용하여 다양한 생체재료와 고분자를 방사하여 나노섬유막을 쉽게 제조할 수 있는 방법이다. 다양한 전기방사 의료기기, 약물 전달 시스템 및 임플란트가 개발되었다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) KR 10-2011-0048674 (2011-05-23)
(특허문헌 0002) KR 10-2015-7020712 (2013-12-30)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명자들은 당뇨병의 근본적인 치료를 위한 인슐린 분비 세포의 분화 및 이식 기술을 제공하고자 예의 노력한 결과, 본 발명의 투과성 나노섬유(NF) 마이크로웰 배열 막 제조에 성공하였으며, 이는 제한된 분화 능력을 해결하고 수확 없이 분화된 인슐린 생산 세포 응집체를 in situ 이식할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0011] 따라서, 본 발명의 목적은 다공성 마이크로웰 어레이에 줄기세포를 시딩하여 배양 및 분화된 인슐린 분비세포 응집체 내지 상기 인슐린 분비세포 응집체를 담지한 생분해성의 다공성 마이크로웰을 포함하는 당뇨병 치료용 세포이식체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명은 다공성 마이크로웰 어레이에 줄기세포 또는 전구세포(progenitor cell)를 시딩하여 배양하는 단계; 를 포함하는 인슐린 분비세포 응집체로의 분화 방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 줄기세포는 유도 만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell), 배아줄기세포(embryonic stem cell) 또는 성체 줄기세포(adult stem cell) 인 것이다.
- [0015] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 마이크로웰은 직경이 400 ~ 1,000 μm 이고, 깊이가 120 ~ 900 μm 인 것이다.
- [0016] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 다공성 마이크로웰의 기공 크기는 0.01 ~ 10 μm 이고, 공극률은 3 % ~ 25 % 인 것이다.
- [0017] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 다공성 마이크로웰의 용해성 인자에 대한 물질 투과성은 $1 \times 10^{-7} \text{ cm/s} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ 인 것이다.
- [0018] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 용해성 인자는 포도당(glucose), ROCK 억제제, 액티빈 A(activin A), GSK-3 억제제, 도르소모르핀(dorsomorphin), 레티노산(retinoic acid), ALK5 억제제, SANT-1, 인슐린 및 성장인자 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것이다.
- [0019] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 다공성 마이크로웰은 100 nm ~ 2000 nm 직경의 생분해성 고분자 나노섬유로 구성된 것이다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 분화 방법은
- [0021] i) 상기 시딩된 줄기세포 또는 전구세포를 내배엽(definitive endoderm) 세포로 유도하는 단계;
- [0022] ii) 상기 유도된 내배엽 세포를 췌장 전구세포(pancreatic progenitor cell)로 유도하는 단계; 및
- [0023] iii) 상기 유도된 췌장 전구 세포를 인슐린 생산 세포로 유도하는 단계;
- [0024] 를 추가적으로 포함하는 것이다.
- [0025] 본 발명은 상기 분화방법으로 분화된 줄기세포 또는 전구세포(progenitor cell) 유래 인슐린 분비 세포 응집체를 제공한다.
- [0026] 본 발명은 상기 분화방법으로 분화된 줄기세포 또는 전구세포(progenitor cell) 유래 인슐린 분비 세포 응집체를 담지한 다공성 마이크로웰을 포함하는 세포이식체를 제공한다.
- [0027] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 다공성 마이크로웰은 생분해성 다공성 마이크로웰인 것이다.
- [0028] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 생분해성 다공성 마이크로웰은 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL), PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)), PGA(poly(glycolic acid)) 및 PLA(poly(lactic acid)) 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것이다.
- [0029] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 세포이식체는 당뇨병 치료용인 것이다.
- [0030] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 세포이식체는 단독으로 부착하여 이식 가능한 것이다.

발명의 효과

- [0032] 본 발명은 전기방사 투과성인 생분해성 폴리카프로락톤(PCL) NF 멤브레인에 정형 공정을 사용하여 NF 마이크로웰 어레이 멤브레인을 제작했기 때문에 가스 및 용해성 인자를 투과시킬 수 있었다. 본 발명의 NF 마이크로웰은 일반적인 불투과성 PDMS 마이크로웰보다 iPSC 응집체에 더 많은 영양소를 제공할 수 있으며, 세포의 생존 및 분화 기능을 향상시킬 수 있었다. 또한, NF 막은 고정 물질 없이 피하 및 간 및 복막과 같은 장기 표면에 별도의 봉합 없이 단독으로 부착되어 주변 조직과 통합되어 PDMS 마이크로웰보다 더 높은 인슐린 분비를 나타냈다. 따라서, 본 발명은 당뇨병 치료용 조성물로서 효과적으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034]

도 1a 는 NF 마이크로웰의 면내 다공성, 공극 크기 내지 공극률을 조사한 이미지를 나타낸다. 왼쪽은 SEM 이미지, 오른쪽은 공극을 나타내는 흑백 (이진) 이미지를 나타낸다. 스케일 바: 4 μm .

도 1b 는 NF 마이크로웰의 면내 다공성, 공극 크기 내지 공극률을 조사한 이미지를 나타낸다. 왼쪽은 SEM 이미지, 오른쪽은 공극을 노란색 테두리로 나타내는 이미지를 나타낸다. 스케일 바: 3 μm .

도 2 는 NF 마이크로웰에 있는 인간 iPSC 응집체 주변의 NF 마이크로웰 배열 멤브레인 및 마이크로 환경의 기하학적 및 투과성 특성을 나타낸다. (A) NF 마이크로웰 배열 막의 SEM 이미지 및 단면 공초점 이미지, 스케일 바: 400 μm . (B) iPSC 응집체를 향한 투과성 NF 마이크로웰을 통한 가용성 인자 투과의 모식도. (C) PDMS 불침투성 및 NF 마이크로웰의 인플레인 다공성을 나타내는 공극률. (D) 불투과성 PDMS 및 NF 마이크로웰 모두에서 iPSC 응집체 주변의 포도당 농도의 공간적 및 시간적 분포의 수치 시뮬레이션. (E) 48시간 동안 Ad-GFP의 형질도입 후 PDMS 및 NF 마이크로웰에서 세포의 GFP 발현, 스케일 바: 200 μm . * 은 PDMS와 NF 마이크로웰의 통계적 차이를 나타낸다. $p < 0.05$ 는 유의한 차이를 나타낸다.

도 3a 는 다공성 마이크로웰의 다양한 직경(400, 600 및 800 μm)을 나타낸다.

도 3b 는 다공성 마이크로웰의 깊이(중형비)에 따른 세포 배양 결과를 나타낸다. 왼쪽은 중형비가 0.3인 경우의 세포배양결과, 오른쪽은 중형비 0.9일 경우의 세포배양 결과를 나타낸다.

도 3c는 맞춤형으로 설계된 12웰 삽입 벽에 통합된 NF 마이크로웰 어레이 멤브레인을 나타낸다.

도 4a 은 용해성 인자 투과에 대한 정성적 도면으로서, 적색 염료 용액을 이용한 NF 마이크로웰 어레이 멤브레인을 통한 확산 수송 테스트 결과를 나타낸다.

도 4b는 용해성 인자 투과에 대한 정량적 도면을 나타낸다.

도 5a 는 인간 iPSC 배양 및 분화를 나타낸다. (A) 2D 배양 플레이트 및 마이크로웰의 iPSC에서 IPC 분화 프로토콜의 개요로서, 보충제 및 첨가제를 포함한 3단계 차별화 프로토콜. (B) 파종 후 6, 80 및 96시간에 PDMS 마이크로웰에 있는 세포의 대표적인 현미경 이미지, 축적 막대: 400 μm (저배율), 200 μm (고배율).

도 5b 는 인간 iPSC 배양 및 분화를 나타낸다. (C) 시당 후 1, 7 및 14일에 NF 마이크로웰에 있는 세포의 SEM 이미지, 스케일 바: 300 μm . (D) 21일째에 NF 마이크로웰에 있는 IPC 응집체 단면의 면역조직화학(PDX1 및 인슐린) 및 H&E 이미지, 스케일 바: 200 μm .

도 6a 는 2D, PDMS 마이크로웰 및 NF 마이크로웰에서 IPC의 분화 효능으로서, 6일, 10일 및 17일에 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 아밀라아제, CK19 및 췌장 특이적 전사 인자의 유전자 발현($n = 4$)을 나타낸다. 동일한 cDNA 샘플에 대한 GAPDH 유전자 발현으로 정규화된 결과는 평균 $\pm$ SD의 상대 수준으로 표시되었다. * 는 각 시점에서 세 그룹 간의 통계적 차이를 나타낸다. $p < 0.05$ 는 유의한 차이를 나타낸다.

도 6b 는 2D, PDMS 마이크로웰 및 NF 마이크로웰에서 IPC의 분화 으로서, 17, 19 및 21일에 IPC에서 인슐린 분비($n = 4$)를 나타낸다. * 는 각 시점에서 세 그룹 간의 통계적 차이를 나타낸다. $p < 0.05$ 는 유의한 차이를 나타낸다.

도 7a 는 당뇨병 치료를 위한 IPC 응집체를 포함하여 NF 마이크로웰 배열 막의 분화 및 in situ 이식의 실험 절차 계획을 나타낸다. 세포는 NF 마이크로웰에서 분화하도록 유도되었으며, 마이크로웰에 분화된 IPC 응집체를 포함하는 NF 막을 당뇨병 치료를 위해 이식하였다.

도 7b 는 NF 마이크로웰에서 IPC 응집체 이식 당일의 광학 이미지로서, 피하 부위, 간 표면 및 복막 벽에 NF 막을 이식한 마우스를 나타낸다. 3개 부위에 막 이식이 성공적으로 수행되었다. 이식 2개월 후의 광학 이미지 및 조직학 이미지로서 노란색 원은 IPC가 있는 이식된 NF 마이크로웰 배열 막을 나타낸다. 빨간색 화살표는 PDX1 양성 세포를 나타내고, 노란색 화살표는 인슐린 양성 세포를 나타낸다. 눈금 막대: 200 μm .

도 7c 는 2개의 NF 막으로 이식된 마우스의 혈장 내 인간 C-펩티드(Human C-peptide) 수준($n = 3$)을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0037] 췌도(pancreatic islet) 이식은 혈당의 생리적 변화에 대한 정확한 실시간 반응, 비침습성 및 간단한 적용으로 인해 이론적으로 인슐린 의존성 당뇨병의 이상적인 치료법이다. 그러나 이식용 췌도는 사체 췌장에서만 얻을 수 있어 모든 당뇨병 환자에게 기증자로부터 췌도를 구하여 분리하는 것은 어려운 일이다. 또한, 분화 능력이 낮으며 면역 반응으로 인해 이식 효율이 충분하지 않고, 혈관 주입을 통한 현재 이식 방법의 심각한 합병증의 위험도 있다. 따라서 당뇨병 환자의 표준 치료법으로 새로운 섬 소스 및 이식 기술의 개발이 필요한 실정이다.

[0038] 줄기세포에서 분화된 인슐린 생산 세포는 기존 췌도의 임상 적용 한계를 극복할 수 있는 잠재적인 접근 방식이다. 많은 연구 그룹에서 줄기세포를 이용한 인슐린 생산 세포(IPC, insulin-producing cells)의 분화와 관련된 기술 및 응용에 대해 보고하고 있다. 그러나 그들은 생체 내에서 정상적인 췌장처럼 기능하지 않았다. 세포 기능과 분화 능력을 향상시키는 가장 성공적인 방법은 자연 환경을 모방하는 것이다. 즉, IPC의 분화 능력을 향상시키기 위해 세포 응집체 형성은 섬(islet)의 3D 구조를 모방하는데 필수적이고 중요하다. 췌도 세포의 독특한 특징은 세포가 100-300 μm 의 구형을 형성한다는 것이다. 공학과 생물학의 융합으로 인해 세포 응집체는 대량 생산 방식으로 균일한 크기와 원하는 모양의 마이크로웰 어레이로 쉽게 만들어진다. 그러나 기존에 사용하던 불침투성 마이크로웰은 이 매우 좁은 공간 내부의 세포에 영양과 산소 공급이 충분하지 않아 저산소증이나 기능 저하를 초래하는 한계가 있었다. 따라서 본 연구에서는 이러한 문제를 해결하기 위해 다공성 및 투과성 NF 멤브레인으로 만든 마이크로웰을 개발하여 적용하였다.

[0039] 이전 연구에서 다공성 멤브레인 바닥 또는 하이드로겔을 사용하여 투과성 마이크로웰을 만들고 적용하려는 시도가 있었다. 그러나 대부분의 다공성 마이크로웰은 약물 스크리닝을 위한 단단한 프레임 가지고 있어 직접 이식이 불가능했다. NF 멤브레인만으로 만들어진 마이크로웰은 최근 보고된 바와 같이 높은 투과성을 가질 뿐만 아니라, 유연하고 얇고 생분해되고 생체적합성인 멤브레인을 이식하기 쉽기 때문에 표적 조직에 직접 이식이 가능하다. 본 발명에서 우리는 이전 발명을 개선하여 당뇨병 치료를 위한 투과성 NF 마이크로웰 배열 막을 성공적으로 제작했다. 간단히 말해서, 마이크로웰은 세포-세포 상호작용을 유도하고 배양된 세포의 응집체 형태를 유지하기 위해 일치된 몰드 형성 공정을 사용하여 제조된다.

[0040] NF 마이크로웰을 통해 iPSC 응집체를 향한 포도당의 확산 수송은 섬이 포도당 농도에 반응하여 인슐린을 분비하는 생리학적 기능을 가지고 있기 때문에 중요하다. 따라서 우리는 인슐린 생산 세포 분화 배지의 다양한 물질 중 대표적인 분자로 포도당을 선택하고 컴퓨터 시뮬레이션 방법을 사용하여 iPSC 응집체 주변의 포도당 농도를 추정했다. 불침투성 마이크로웰에서 24시간 동안 세포를 배양했을 때 바닥의 세포에 포도당이 충분히 공급되지 않았다. NF 멤브레인으로 만들어진 마이크로웰에는 모공을 통해 영양분이 공급되었다. 용해성 인자의 확산 수송과 관련된 실험적 확인은 수치적 분석을 뒷받침한다. 또한, 직접 아데노바이러스 벡터를 사용하여 세포를 형질 도입함으로써 이미 형성된 응집체 구조에 바이러스가 잘 침투할 수 있음을 보여주었다. PDMS 불투과성 마이크로웰의 경우 응집체가 단단하게 형성되어 있으며, 상부에만 영양성분이나 바이러스 등의 인자가 공급되어 일부에서만 GFP가 발현되도록 하였다. 그러나 바이러스 입자는 NF 막의 기공을 통해 마이크로웰에 잘 침투하였다.

[0041] 췌장 관련 유전자 발현과 인슐린 분비를 분석하여 다양한 배양 조건에서의 IPC 분화 능력을 비교하였다. iPSC에서 IPC로의 분화를 유도하는 것은 또한 췌장 발달 과정에 존재하는 다른 관련 세포와 인슐린 분비 β 세포로의 분화를 유도한다. 췌장은 다른 내분비 세포(α -세포를 분비하는 글루카곤, δ 세포를 분비하는 소마토스타틴), 외분비 세포, 세노관 세포 등으로 분화될 수 있으며, 미분화 세포로도 존재할 수 있다. 다른 세포로의 분화를 방지하고 원하는 인슐린 생산 세포의 분화 기능을 향상시키는 것이 필요하다. 따라서 인슐린 이외의 췌장 전사 인자의 발현을 확인하여 이들의 분화 과정을 평가하였다. 췌장 관련 유전자 발현은 모든 배양 조건에서 분화가 진행됨에 따라 시간이 지남에 따라 점진적으로 증가하였다. NF 마이크로웰의 IPC 응집체는 가장 높은 인슐린 및 췌장 발달에 중요한 전사 인자인 PDX1 발현을 나타냈다. 세포 응집체를 형성함으로써 세포간 상호작용이 유지되고, 모공을 통해 충분한 분화인자와 산소가 공급되어 분화능이 향상되었다. 또한, NF 마이크로웰에서 CK19 및 아밀라아제 발현이 감소하여 마이크로웰을 사용한 응집체 형성이 분화된 iPSC를 내분비 세포로 유도할 수 있고 덕트 또는 외분비로의 원치 않는 트랜스-분화를 억제할 수 있음을 시사한다. PDX1, ISL1, NKX2.2 및 NGN3을 포함한 췌장 특이적 전사 인자는 2D 배양과 비교하여 두 마이크로웰 배양에서 모두 증가했다. 놀랍게도 MafA는 후기 단계에서 NF 마이크로웰에서만 발현되었다. 췌장 발달의 후기 단계에서 글루카곤 분비 알파 세포의 억제와 인슐린 분비 베타 세포로의 분화 유도는 분화의 선택성과 효율성을 높이는 데 중요하다. MafA는 발달 중 베타 세포의 선택적 분화에 관여하는 중요한 전사 인자이며 후속 인슐린 분비 기능에도 관여한다. 동시에 인슐린 과립

에서 포도당 농도를 인지하고 인슐린을 분비하는 막 수송체인 GLUT2가 NF 막 배양 세포에서 가장 높게 발현되어 인슐린 분비 실험을 통해 인슐린 분비 능력이 향상됨을 확인하였다.

[0042] 현재 대부분의 체도는 생리학적인 인슐린 전달 환경에서 간이 충분한 혈액을 공급할 수 있기 때문에 임상에서 문맥을 통해 직접 투여된다. 그러나 수술 관련 합병증, 출혈, 간성 고혈압, 혈전증 및 면역 반응을 포함하여 문맥 내 주입에 관한 몇 가지 문제점이 남아 있다. 신장피막, 복막벽, 간표면, 장막, 피하영역, 각막 등 다양한 대체 부위가 제안되었다. 일부 위치는 실험 모델에서 유리할 수 있지만 실행 가능성과 임상 환경으로의 번역은 여전히 과제이다. 피하 부위는 혈액 공급이 원활하지 않고, 신장 피막과 각막은 이식 공간이 제한되어 있으며, 간 표면이나 복막 벽에 세포를 유지하기 위해 특별한 기술이 필요하다.

[0043] 간문맥으로의 간내 주사는 임상에서 체도 이식을 위해 널리 사용되지만, 본 발명에서는 멤브레인 형태로 이식되었기 때문에 주입 방법을 사용하지 못했다. 본 발명의 목적은 IPC의 안전하고 효과적인 국소 전달 기술을 개발하는 것이므로 임상 시험에서 사용할 수 있는 모든 위치인 간 표면, 복막벽 및 피하 부위에 막을 이식하여 그 효능을 평가하였다. 또한 신장 캡슐은 이식된 세포를 주머니에 보관하고 혈관이 풍부하여 동물에 세포를 이식하는데 널리 사용된다. 그러나 이 기술을 사용하면 마이크로웰 배열된 막 형태의 세포를 모든 조직 및 기관에 국소 적용할 수 있으므로 공간이 협소하여 신장 캡슐을 사용하지 않았다. 본 출원인이 선택한 부위는 신장에 비해 혈류가 풍부하지 않지만 임상 적용에 적합한 기관으로 간주된다. 이식 효율을 향상시키기 위해서는 이식 전 혈관전형성을 이용한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

[0044] 얇은 시트나 막을 고정하지 않고도 다양한 장치에 부착할 수 있기 때문에 본 출원인이 개발한 NF 막은 이러한 조직이나 장기 표면에 쉽게 이식된다. 복막이나 간 표면의 온전하고 매끄러운 표면에 약간의 흡집을 내어 접착력을 향상시킬 수 있다. 피하 부위의 경우 근막과 피부 사이에 이식하였기 때문에 접착력 향상을 위한 노력 없이 잘 이식되었다. 동물 희생 후 이식 부위를 확인한 결과, 육안 및 조직 사진을 통해 주변 조직과 잘 접촉 및 융착됨을 확인하였다. 조직학적 평가를 통해 이식된 세포가 2개월 후에도 잘 생존하여 인슐린을 분화 및 분비함을 확인하였다. 여기에 사용된 시스템의 장점은 생물 의학 응용 분야에서 FDA의 승인을 받은 PCL의 우수한 생체 적합성으로 인해 IPC 응집체를 포함한 NF 마이크로웰 어레이 멤브레인을 이식할 수 있다는 것이다. 기존의 마이크로웰에서 세포 응집체는 이식을 위해 마이크로웰에서 수확하고 하이드로겔에 캡슐화해야 하며, 그렇지 않으면 주머니가 형성될 수 있는 곳에서만 이식이 가능하다. 그러나 여기서 개발된 마이크로웰은 NF 막을 직접 이식할 수 있기 때문에 추가적인 세포 처리가 필요 없고 이식 부위에 제한이 없다. 또한, 다공성 NF막으로 인해 상부표면이 개방되어 있을 뿐만 아니라 모공을 통해서도 영양분이 공급되기 때문에 상대적으로 혈관이 작은 피하세포의 경우 투과막 주위에 작은 인슐린분비세포가 모여 형성되어 독특하고 차별화된 구조를 확인할 수 있었다. 간 표면과 복막 벽에는 충분한 혈액 공급이 있었다. 따라서 이식된 세포는 마이크로웰 전체에 분포되었다.

[0045] 이전 연구에서는 분화된 세포를 이식할 때 혈당을 낮추는 데 한계가 있었다. 본 발명에서는 혈액에서 분비되는 c-펩타이드를 측정하여 효능을 평가하였다. 모든 이식군에서 이식 후 1개월째 쥐에서 c-펩타이드가 검출되었으나 그 수준은 매우 낮았다. 그러나 이식 2개월 후 대부분의 이식 동물에서 인간 c-펩타이드 분비가 확인되었다. 이식 후 비교적 짧은 기간에 비해 시간이 지남에 따라 혈액 내 인슐린 또는 c-펩타이드의 분비 증가는 분화된 세포가 in vitro에서 미성숙하지만 in vivo에서는 분화된 IPC의 성숙이 진행됨에 따라 인슐린의 양이 증가하기 때문인 것으로 판단하였다.

[0047] 따라서, 본 발명은 다공성 마이크로웰 어레이에 줄기세포 또는 전구세포(progenitor cell)를 시딩하여 배양하는 단계; 를 포함하는 인슐린 분비세포 응집체로의 분화 방법을 제공할 수 있다.

[0048] 상기 '다공성 마이크로웰 어레이'는 다수의 '다공성 마이크로웰'로 구성된 멤브레인 구조를 의미할 수 있다.

[0049] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 줄기세포는 유도 만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell), 배아줄기세포(embryonic stem cell) 또는 성체 줄기세포(adult stem cell) 인 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 상기 줄기세포는 인간 유도 만능 줄기세포(human induced pluripotent stem cell), 인간 배아줄기세포(human embryonic stem cell) 또는 인간 성체 줄기세포(human adult stem cell) 인 것일 수 있다.

[0050] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 다공성 마이크로웰은 입구 직경이 400 ~ 1,000 μm 이고, 깊이가 120 ~ 900 μm (직경 X 종횡비(0.3~0.9))인 것일 수 있다. 보다 바람직하게는, 상기 마이크로웰은 직경이 400 ~ 800 μm 이고, 깊이가 360 ~ 900 μm 인 것일 수 있다.

[0051] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 다공성 마이크로웰의 기공 크기는 0.01 ~ 10 μm 이고, 공극률은

3 % ~ 25 % 인 것일 수 있다.

- [0052] 기공의 크기가 0.01 μm 미만일 경우, 영양분 및 분화인자 같은 세포배양액에 녹아있는 용해성 인자의 투과가 제한되며, 10 μm 초과일 경우 세포가 마이크로웰을 투과해 하부방향으로 유실될 우려가 있다.
- [0053] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 다공성 마이크로웰의 용해성 인자에 대한 물질 투과성은 $1 \times 10^{-7} \text{ cm/s} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ 인 것일 수 있다.
- [0054] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 용해성 인자는 포도당(glucose), ROCK 억제제, 액티빈 A(activin A), GSK-3 억제제, 도르소모르핀(dorsomorphin), 레티노산(retinoic acid), ALK5 억제제, SANT-1, 인슐린 및 성장인자 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0055] 상기 ROCK 억제제는 Y-27632 일 수 있고, 상기 GSK-3 억제제는 CHIR99021 일 수 있으며, 상기 ALK5 억제제는 SB431547 일 수 있다.
- [0056] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 다공성 마이크로웰은 100 nm ~ 2000 nm 직경의 생분해성고분자 나노섬유로 구성된 것일 수 있다.
- [0057] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 분화 방법은
- [0058] i) 상기 시딩된 줄기세포 또는 전구세포를 내배엽(definitive endoderm) 세포로 유도하는 단계;
- [0059] ii) 상기 유도된 내배엽 세포를 췌장 전구세포(pancreatic progenitor cell)로 유도하는 단계; 및
- [0060] iii) 상기 유도된 췌장 전구 세포를 인슐린 생산 세포로 유도하는 단계;
- [0061] 를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0063] 또한, 본 발명은 상기 분화방법으로 분화된 줄기세포 또는 전구세포(progenitor cell) 유래 인슐린 분비 세포 응집체를 제공할 수 있다.
- [0064] 또한, 본 발명은 상기 분화방법으로 분화된 줄기세포 또는 전구세포(progenitor cell) 유래 인슐린 분비 세포 응집체를 담지한 생분해성 마이크로웰을 포함하는 세포이식체를 제공할 수 있다.
- [0065] 상기 마이크로웰은 상기 세포이식체에서 사용된 개념과 동일하므로 설명은 그 기재로 대신한다.
- [0066] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 다공성 마이크로웰은 생분해성 다공성 마이크로웰인 것일 수 있다.
- [0067] 상기 생분해성 마이크로웰은 생체 내에서 분해될 수 있는 생체 고분자는 모두 포함할 수 있으나, 바람직하게는 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL), PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)), PGA(poly(glycolic acid)) 및 PLA(poly(lactic acid)) 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있으며, 바람직하게는 폴리카프로락톤일 수 있다.
- [0068] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 세포이식체는 당뇨병 치료용인 것일 수 있다.
- [0069] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 세포이식체는 구부러지기 쉬운 특성으로 인하여 복막, 피하 또는 간 표면 등 원하는 부위에 별도의 봉합 없이 단독으로 부착하여 이식 가능한 것일 수 있다.
- [0071] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석하지 않는 것은 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명한 것이다.

실시예 1

- [0073] NF 마이크로웰 어레이 멤브레인의 제작

[0074] <1-1> NF 멤브레인 제조를 위한 전기방사

[0075] 폴리카프로락톤(PCL; $M_n = 80,000\text{g/mol}$), 클로로포름 및 메탄올은 Sigma-Aldrich(USA)에서 구입하여 받은 그대로 사용했다. 전기방사 용액은 PCL을 클로로포름/메탄올(3:1 vol: vol)의 혼합물에 용해시켜 농도가 7.5 중량%가 되도록 제조하였다. 그런 다음 준비된 PCL 용액을 5mL 기밀 주사기(Hamilton, USA)에 넣고 직경 20mm의 링수집기 위 10cm에 위치한 23게이지 금속 바늘을 통해 공급했다. 이후, 상용 전기방사기(ESR200R2, NanoNC, South Korea)를 이용하여 전기방사를 수행하였다. 유속은 1mL/h로 설정하고 전기방사를 위해 금속 모세관과 링컬렉터 사이에 15kV의 고전압을 인가하였다. 전기방사 동안 상대습도 50~60%, 온도 20~25℃를 유지하였다. 방사된 PCL 나노섬유는 접지된 링 수집기에 무작위 방향으로 증착되어 NF 멤브레인이 형성되었다. 준비된 평평한 NF 멤브레인을 독립형 구성의 접착제로 덮인 폴리(메틸 메타크릴레이트)(PMMA) 링으로 옮겼다.

[0077] <1-2> 한 쌍의 제1몰드 및 제2몰드 제작

[0078] NF 마이크로웰 어레이 멤브레인은 전기방사된 평평한 NF 멤브레인과 일치하는 몰드 형성 공정에 의해 제작되었다. 마이크로웰 어레이의 원하는 형상을 위한 제2몰드는 PMMA 기관(AcrylChoika, South Korea)에 tapered ball-end milling cutter가 있는 micromachining machine (EGX-360, Roland, USA)을 사용하여 준비했다. PDMS(폴리디메틸실록산) 제1몰드는 제2몰드에 대해 PDMS 복제 성형에 의해 준비되었다. 요약하면, PDMS와 경화제의 중량비 5:1(Sylgard 184, Dow Corning, USA)의 미경화 혼합물을 암형에 붓고 55℃의 대류식 오븐(convection oven)에서 12시간 동안 구웠다.

[0080] <1-3> 한 쌍의 제1몰드 및 제2몰드를 사용하여 NF 마이크로웰 어레이 멤브레인 제작

[0081] 실시예 <1-1>에 기재된 바와 같이 PMMA 링으로 옮겨진 평평한 PCL NF 멤브레인을 제1몰드 및 제2몰드 사이에 배치했다. 수형의 움직임은 2.0mm/s의 일정한 속도로 움직이는 전동 스테이지(KS162-200, Suruga Seiki, Japan)에 의해 제어되었으며 단일 포인트 로드셀(BCL-2L, CAS scale, South Korea) 압축력을 검증한다. 평평한 NF 멤브레인에 압축력을 가한 제2몰드와 일치하도록 제1몰드를 변위시켰다. 10초 동안 제1몰드의 일치된 위치를 유지하고 원래 위치로 이동시킨 후 변형된 NF 멤브레인을 제2몰드에서 조심스럽게 분리하여 165개의 마이크로웰을 포함하는 NF 마이크로웰 배열 멤브레인을 생성했다. NF 멤브레인은 사출 성형기(SE50D, Sumitomo, Japan)로 생산된 멤브레인이 없는 맞춤형 12웰 인서트 벽의 바닥 개구부와 최종적으로 통합되었다. 구체적으로, 레이저 커터(ML-7050A, MachineShop, South Korea)를 이용하여 링 형태의 양면테이프(내경 12mm, 외경 15mm; 467MP, 3M, USA)를 제작하여 인서트 벽의 하단 개구부에 부착하였다. 그런 다음 NF 마이크로웰이 있는 PMMA 링을 양면테이프를 사용하여 삽입 벽과 통합했다. 마이크로웰 인서트는 기존의 12웰 플레이트의 배열 배지에 담그도록 설계되었다. 세포 배양 전 남아있는 유기용매를 동결건조기로 48시간 제거하고 저온 EO 가스로 36시간 살균하였다.

실시예 2

[0083] NF 마이크로웰 어레이 멤브레인의 기하학적 및 투과성 확인

[0084] <2-1> NF 마이크로웰의 모양, 나노섬유 구조 및 면내 다공성

[0085] 맞춤형 12-well 삽입 웰에 통합된 NF 마이크로웰 배열 멤브레인의 평면도는 DSLR 카메라(EOS650, Canon, Japan)를 사용하여 사진을 획득하여 조사했다. 전계 방출 주사 전자 현미경(FE-SEM, SU6600, Hitachi, Japan)으로 획득한 SEM 이미지를 사용하여 보다 자세한 전체 보기도 촬영했다. 상호 연결된 나노섬유의 구조는 SEM 이미지의 고배율을 사용하여 조사되었다. 고배율의 SEM 이미지상 고분자섬유의 직경은 100 nm 이상 3 μm 미만으로 확인되었다(도 1a 왼쪽). 고분자 섬유의 직경을 측정하기 위하여 scale bar와 비교하여 Image J 소프트웨어(NIH, USA) 프로그램을 활용하여 개개의 섬유의 직경을 측정하였다.

[0086] 또한, 상호 연결된 나노섬유의 면내 다공성을 특성화하기 위해 확대된 SEM 이미지를 ImageJ 소프트웨어(NIH, USA)에서 임계값 프로세스를 통해 이진 이미지로 변환하여 나노섬유 마이크로웰의 공극을 나타내고 이의 크기를 분석하였다(도 1a 오른쪽).

[0087] 그 결과 공극의 크기는 1 μm 이상 10 μm 미만이므로 용해성 인자의 투과는 용이하나 세포는 투과 하지 못하는 것을 확인하였다. 일반적으로 세포의 크기는 10 μm 이다. 상기 이진(흑백) 이미지와 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 기공 및 나노섬유의 면적 분율을 계산하여 마이크로웰의 면내 다공성을 계산하여 측정했다 (도 2의 C). 그 결과, 다공성 마이크로웰의 면내 공극률 (In-plane porosity)은 5 % 내외 인것을 확인할 수 있었다.

[0088] 추가적으로, 전기 방사 증착 시간을 보다 짧게 조절하여 상기와 동일한 방법으로 멤브레인을 생성하고 동일한 방법으로 면내 공극률을 측정한 결과, 10 % 내외 인것을 확인하였다(도 1b).

[0089] 이어서, NF 마이크로웰 어레이를 실온에서 6시간 동안 로다민 6G(5mg/ml in PBS)로 염색한 후 광학 현미경 (Eclipse 80i, Nikon, Japan) 및 공초점 현미경(FV3000, Olympus, Japan)으로 마이크로웰의 단면 이미지를 얻었다. 그 결과, 마이크로웰의 깊이는 250 μm 인것을 확인하였다 (도 2의 A).

[0091] <2-2> NF 마이크로웰 어레이 멤브레인을 통한 확산 수송 테스트

[0092] NF 벽을 통한 용해성 인자의 확산 수송은 분자량이 9-155 kDa인 말토텍스트린으로 구성된 적색 염료(Edentown, South Korea)를 사용하여 실험적으로 입증되었다. NF 마이크로웰의 basolateral side에 2mL의 200 $\mu\text{g/mL}$ red 염료를, water apical side 2mL를 배치한 후, DSLR 카메라를 사용하여 사진을 획득하여 확산 수송 시간을 평가했다. 마이크로웰에서 iPSC 응집체의 가용성 인자를 확인하기 위해 아데노바이러스 GFP 발현 벡터(Ad-GFP, Vector Biolabs, USA)의 형질도입 후 형광 현미경을 사용하여 PDMS 마이크로웰 또는 NF 마이크로웰에서 48시간 동안 MOI 200으로 iPSC의 GFP 발현도 확인했다.

[0093] 추가적으로, 용해성 인자 투과에 대한 정량적 값을 확인하기 위하여 0.5 ml 용량의 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 농도의 FITC-dextran 용액이(분자량 : 20 kDa) 확산을 통해 나노섬유 마이크로웰을 투과하는 정량화 하였다. 좀 더 상세하게는, 상기 용액을 나노섬유 마이크로웰의 상부 챔버에 수용 시키고, 하부 챔버에는 물을 수용 시켰다. 1시간 후, FITC-dextran 용액이 확산에 의해 나노섬유 마이크로웰을 투과한 것을 정량화 하기위해 100 μl 의 하부챔버 용액을 공초점 현미경 (FV3000, Olympus, Japan)으로 관찰하여 FITC-dextran의 용액을 분석하였다. 그 후, 하기 [수학식 1]을 이용해서 permeability를 계산하였다.

[0094] [수학식 1]

$$P = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{AC_0}$$

[0096] 상기 수식에서 P는 the permeability coefficient (cm s^{-1}), dQ/dt 는 the diffusive transport rate of FITC-dextran ($\mu\text{g s}^{-1}$), A 는 나노섬유 마이크로웰의 면적 (cm^2), and C_0 는 FITC-dextran 용액의 상기 상부챔버에서 초기 농도 ($\mu\text{g cm}^{-3}$)이다. 그결과, 나노섬유 마이크로웰의 투과성은 $42.58 \pm 1.72 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ 로 확인 되었다 (도 4b). 이는 종래 불투과성 마이크로웰의 불투과성과 대비 되었다.

[0098] <2-3> NF 및 불침투성 마이크로웰에서 iPSC 응집체를 둘러싼 포도당 농도의 수치적 분석

[0099] iPSC 응집체 주변의 시공간 포도당 농도는 COMSOL Multiphysics®소프트웨어(version 5.0, USA)를 사용하여 수치적으로 시뮬레이션되었다. 수치 시뮬레이션에 사용된 모든 형상과 치수는 실험 설정에 사용된 형상에 반영되었다. NF 및 불투과성 마이크로웰의 바닥에 iPSC 응집체의 평균 직경(300 μm)에 해당하는 구형 공극 공간이 도입되어 iPSC 응집체를 시뮬레이션했다. 초기 포도당 농도는 사용된 RPMI1640 세포 배양 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY)의 해당 농도와 동일한 11.1mol m⁻³로 설정되었다. 구형 공극의 경계를 따라 포도당 소모율은 이전에 보고된 체도 스페로이드의 실험적으로 측정된 포도당 소모율을 기반으로 0.267 mol m⁻³ s⁻¹로 계산되었다. 배양액 내 포도당 농도의 확산계수는 580 $\mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ 이므로 본 시뮬레이션에서는 모의하였다. NF 마이크로웰의 다공성은 Millington-Quirk 모델을 사용하여 다공성 물질의 용질 확산성을 예측하기 위해 <실시예 1>에 설명된 대로 측정된 평면 내 다공성(도 1a 및 도 1b)를 기반으로 0.046으로 추정되었다. 반대로, 불투과성 마이크로웰의 다공성은 0으로 설정하였다.

[0101] 그 결과, [도 2] A 에서 나타나는 바와 같이 평평한 NF 멤브레인의 정합 성형 공정은 NF 마이크로웰(직경 500 μ m, 깊이 250 μ m) 어레이 멤브레인을 성공적으로 생성했다. [도 3c]는 NF 마이크로웰 배열 멤브레인이 165개의 마이크로웰을 포함하는 맞춤형 12웰 삽입 벽에 통합되었음을 보여준다. 멤브레인의 마이크로웰 어레이 구조를 통해 마이크로웰에서 iPSC를 수집하고 [도 2] B의 구성표에 설명된 대로 iPSC 응집체를 생성할 수 있다. NF 마이크로웰의 가장 중요한 특징은 포도당과 같은 용해성 인자에 대한 투과성이라는 점을 감안할 때, 기존 상용화된 PDMS 불투과성 마이크로웰과 달리 배타 세포 분화를 위한 성장 인자가 NF 막을 통해 iPSC 응집체 쪽으로 투과될 수 있도록 할 수 있다(도 2 B). NF 마이크로웰 외부에서 용해성 인자의 전달은 용해성 인자-투과성 NF 막을 통한 확산 수송을 사용하여 실험적으로 입증되었다. [도 4a]는 적색 염료 용액이 NF 마이크로웰 배열 멤브레인의 기저측 측면에서 정점 측면으로 6시간 동안 점진적으로 확산되었음을 보여준다.

[0102] [도 1a] 및 [도 1b]에 표시된 기공은 용해성 인자의 확산을 허용하는 상호 연결된 나노섬유로 인한 것이다. 기공의 크기는 [도 1a] 및 [도 1b]의 SEM 이미지와 같이 수 마이크로미터에서 10 μ m 미만까지 측정되었으며, 이를 통해 세포는 통과하지 못하지만 영양소 및 폐기물과 같은 용해성 인자는 투과할 수 있다. 용해성 인자-불투과성 PDMS 마이크로웰과 투과성 NF 마이크로웰의 차이에 대한 가장 중요한 이유는 [도 2] C에 설명된 바와 같이 다공성이다. 구체적으로, 불투과성 마이크로웰과 NF 마이크로웰의 면내 다공성은 각각 0과 0.46이었다. [도 2] D는 PDMS 및 NF 마이크로웰의 다공성에 따른 포도당 농도의 수치 분석을 보여준다. PDMS 마이크로웰의 측면과 하단은 불투과성이므로 영양분은 상단에서만 공급된다. 윗면은 24시간 후에도 여전히 영양소가 풍부했지만 세포 응집체가 있는 아랫면은 영양소가 부족했다. 그러나 투과성 NF 마이크로웰의 경우 24시간 후에 일정량의 영양분이 바닥으로 공급되는 것을 알 수 있었다.

[0103] 놀랍게도, 불투과성 PDMS 마이크로웰과 대조적으로, NF 마이크로웰의 미세 환경은 기저 측면에서 투과성 NF 막을 통한 확산 수송으로 인해 iPSC 응집체 주위에 균일한 포도당 농도를 갖는 것으로 밝혀졌다. 다른 실험을 사용하여 수치 분석에서 이러한 미세 환경의 차이를 증명하기 위해 본 발명에 사용된 인간 iPSC를 PDMS에 접촉하고 24시간 후에 NF 마이크로웰과 응집체를 형성했다. 그런 다음 GFP-발현 아데노바이러스 벡터를 두 마이크로웰의 iPSC 응집체에 형질도입하여 48시간 후 GFP 발현을 조사했다. PDMS 마이크로웰의 경우 바이러스가 세포의 상부 표면에만 침투하고 PDMS의 주변벽이 불투과성이어서 한쪽에서 중앙으로 발현되었다. 그러나, GFP를 발현하는 세포는 NF 마이크로웰 내부에 잘 분포되어 있었다(도 2 E).

실시예 3

[0105] **마이크로웰을 사용한 세포응집체 배양**

[0106] <3-1> 마이크로웰 깊이별 세포응집체 배양

[0107] 마이크로웰 깊이에 따른 세포응집체 형성 양상을 확인하기 위해서 인간 간암세포 (human hepatocellular carcinoma, HepG2) 응집체를 나노섬유 마이크로웰에 접촉하여 배양하였다. 종횡비(aspect ratio)가 0.3으로 얇은 마이크로웰의 경우 간암세포 응집체가 하나로 응집되지 못한 반면 (도 3b 왼쪽), 0.9로 깊은 마이크로웰의 경우 간암 세포 응집체가 하나로 잘 응집되는 것을 확인하였다 (도 3b 오른쪽).

[0108] 상기 결과를 기초로, 실시예 1 의 물드의 크기를 변경하여 다공성 마이크로웰의 직경을 400, 600 및 800 μ m로 조절하여 생산 하였다 (도 3a).

[0110] <3-2> 마이크로웰을 사용하여 iPSC에서 IPC 분화

[0111] 인간 iPSC 계통(WTC-11: Coriell Institute, USA)은 Vitronectin(Thermo Fisher Scientific, USA)이 코팅된 접시에서 10 μ M Y-27632(Selleck Chemicals, USA)를 포함하는 인간 배지(MiltenyiBiotec, USA)인 StemMACSiPS-Brew XF에서 유지되었다. 세포 배양은 공기 중 5% CO₂ 하에서 37℃에서 수행되었다. 인간 iPSC는 3단계 프로토콜을 사용하여 인슐린 생산 세포로 분화되었다. 1단계는 다음과 같다: iPSC는 2% FBS(Gibco, USA), 100ng/ml 액티빈 A(PeproTech, USA), 3 μ M CHIR99021(Sigma Aldrich, USA) 및 10 μ M Y-27632를 포함하는 RPMI 1640 배지(Gibco, USA)에서 24시간 동안 처리한 다음 완성 내배엽으로 유도된 후, 2% FBS(Gibco, USA), 100ng/ml 액티빈 A 및 10 μ M Y-27632를 포함하는 신선한 RPMI 1640 배지(Gibco, USA)에서 2일 동안 처리한다. 2단계는 다음과 같다: 세포들은 1% B27 마이너스 인슐린(Gibco, USA), 1 μ M 도르소모르핀(Torci Bioscience,

USA), 2 μ M 레티노산(Sigma Aldrich, USA), 10 μ M SB431547(Selleck Chemical, USA), 0.25 μ M SANT-1(Sigma Aldrich, USA)을 포함하는 개선된 MEM 아연 옵션 배지(Gibco, USA)를 사용하여 배양 전구 세포로 7일 동안 유도되었다. 4일째에 세포를 수확하고 6웰 배양 플레이트, PDMS 마이크로웰 또는 NF 마이크로웰에 10⁶개 세포를 리플레이트했다. 시중에서 판매되는 마이크로웰(StemFIT 3D, Microfit Co. South Korea)을 사용했다. 본 발명자들은 마이크로웰에서 세포 응집을 유도할 마이크로웰 표면에 세포 부착을 방지하기 위해 파종하기 전에 2시간 동안 3% BSA로 플레이트를 코팅했다. 3단계는 다음과 같다: 세포를 1% B27 마이너스 인슐린, 10 μ M 포스폴린(Sigma Aldrich, USA), 10 μ M 텍사메타손(Selleck Chemical, USA), 10mM 니코틴아미드(Sigma Aldrich, USA), 10 μ M Mexendin-4(Torcis Bioscience, USA) 및 1 μ M triiodothyronine(T3, Sigma Aldrich, USA)에서 배양하여 인슐린 생산 세포(IPC)로 유도하였다. 배지는 2일마다 교체되었다.

[0113] <3-3> PDSM 및 NF 마이크로웰에서 세포의 응집체 형성 모니터링

[0114] 4일째에 세포를 수확하고 마이크로웰에 다시 시딩하여 상기 실시예 <3-1>에 설명된 대로 세포 응집체를 만들었다. PDMS 마이크로웰은 투명하기 때문에 광학 현미경을 사용하여 응집체 형성 및 이주를 확인했다. 그러나 NF 마이크로웰은 광학현미경으로 관찰하기 어려워 정해진 시점에 2.5% 글루타르알데히드 용액으로 시료를 고정하고 SEM 이미지를 통해 응집체 형태를 확인했다. SEM 분석을 위해 세포 시드 NF 마이크로웰을 OsO₄ 용액으로 전처리하고 일련의 냉각된 에탄올 용액(70, 80, 90, 95 및 100%)을 사용하여 탈수한 다음 1,1,1, 3,3,3-헥사메틸 실라잔 용액에 1시간 동안 담지하였다. 샘플을 실온에서 건조시켰다. 세포 파종된 NF 마이크로웰의 형태는 SEM(AIS2000C, Seron Technologies, South Korea)을 사용하여 관찰하였다.

[0116] 그 결과, iPSC에서 IPC로의 분화는 배양의 발달 과정을 기반으로 다양한 성장 인자 및 신호 분자를 사용하여 완성 내배엽(DE), 배양 전구 세포(PP) 및 인슐린 생산 세포(IPC)의 3단계에서 유도되었다(도 5a의 A). 분화의 첫 번째 DE 단계에서 많은 세포가 세포 운명과 배양 조건의 급격한 변화로 인해 사멸했다. DE 단계 후, 대부분의 세포가 안정한 전구 세포로 증식하기 시작했다. 4일째에 세포를 수확하고 새로운 2D 배양 플레이트 또는 마이크로웰에 다시 접종했다. 시험관 내에서 3주간 분화 유도 후, IPC 응집체를 포함하는 NF 마이크로웰 배양 막을 수확하여 이식에 사용하였다.

[0117] 응집체 형성 및 형태학적 변화는 PDMS 마이크로웰과 비교하여 NF 마이크로웰에서 관찰되었다. 불침투성 PDMS 마이크로웰의 IPC는 1일째에 회전 타원체를 형성했지만 대부분의 세포는 4일째에 측벽 또는 개구부를 향해 이동하고 구형을 유지하지 않았다(도 5a의 B). 그러나 NF 마이크로웰의 IPC는 최대 2주 동안 마이크로웰 내의 응집체에 남아 있었다(도 5b의 C). 21일 동안 배양한 후, 대표적인 배양 전사 인자인 인슐린 및 PDX1의 발현은 NF 마이크로웰에서 세포의 면역염색에 의해 확인할 수 있었다(도 5b의 D).

실시예 4

[0119] 2D 플레이트, PDMS 마이크로웰 및 NF 마이크로웰에서 IPC 배양의 분화 능력 비교

[0120] <4-1> 정량적 실시간 PCR(qPCR)

[0121] 제조업체의 지침에 따라 TRIzol(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)을 사용하여 6일, 10일 및 15일에 IPC에서 총 RNA를 추출했다. 마이크로웰의 IPC 응집체도 주사기를 사용하여 기계적으로 파쇄되었다. cDNA는 50℃에서 60분 및 70℃에서 15분 동안 SuperScript III First-Strand Synthesis System(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)을 사용하여 oligo-dT 프라이머에 의해 1 μ g RNA 템플릿으로부터 합성되었다. 실시간 PCR은 LightCycler® 480 II 실시간 열 순환기(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)에서 LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 사용하여 수행되었다. 배양 관련 유전자에 대한 프라이머 세트는 하기 [표 1]에 나열되어 있다. 샘플은 다음 절차에 따라 증폭되었다: 95℃에서 5분 동안 증합효소 활성화, 이어서 95℃에서 40주기의 어닐링/연장/검출 10초, 57℃ 45초, 72℃ 60초. 모든 유전자 발현은 GAPDH 하우스키핑 유전자에 대해 정규화되었고, 상대 정량은 델타 CT 방법을 사용하여 수행되었다. 통계 분석은 t-검정을 사용하여 수행되었으며 모든 수치로 보고되었다.

표 1

[0123]

유전자	서열(5'→3')	산물 크기(bp)	서열목록
Amylase	Forward	214	서열번호 1
	Reverse		서열번호 2
CK19	Forward	91	서열번호 3
	Reverse		서열번호 4
GAPDH	Forward	226	서열번호 5
	Reverse		서열번호 6
Glucagon	Forward	221	서열번호 7
	Reverse		서열번호 8
GLUT2	Forward	300	서열번호 9
	Reverse		서열번호 10
Insulin	Forward	67	서열번호 11
	Reverse		서열번호 12
ISL1	Forward	229	서열번호 13
	Reverse		서열번호 14
MAFA	Forward	216	서열번호 15
	Reverse		서열번호 16
NEUROD1	Forward	92	서열번호 17
	Reverse		서열번호 18
NKX2.2	Forward	165	서열번호 19
	Reverse		서열번호 20
NKX6.1	Forward	76	서열번호 21
	Reverse		서열번호 22
PDX1	Forward	140	서열번호 23
	Reverse		서열번호 24
Somatostatin	Forward	90	서열번호 25
	Reverse		서열번호 26

[0125]

<4-2> 인슐린 생산

[0126]

17, 19, 21일에 세포 배양 배지에서 IPC에 의한 인슐린 분비를 확인했다. 배지의 인슐린 함량은 제조사의 지침에 따라 상업용 초민감 인슐린 ELISA Kit(Alpco, NH, USA)를 사용하여 측정되었다. 흡광도는 Microplate Absorbance Reader(Sunrise, Tecan Austria GmbH, Austria)를 사용하여 450 nm에서 측정되었다. IPC 응집체에서 인슐린 및 PDX1 발현의 면역조직화학 이미지를 확인하기 위해 21일째에 NF 마이크로웰의 IPC를 4% 파라포름 알데히드(PFA; Merck, Darmstadt, Germany)에 4℃에서 10분 동안 고정하고 인산염 완충 용액(PBS)으로 두 번 세척했다. 막을 Tissue-Tek(Sakura Finetek, Torrance, CA, USA)에 삽입하고 절편(6μm)하여 동결된 조직 블록을 획득했다. 세포를 25℃에서 10분 동안 0.1% Triton X-100으로 투과화하고 PBS로 3회 세척하였다. 항체 차단을 위해 세포를 실온에서 1시간 동안 3% 소 혈청 알부민에서 배양하였다. 1차 항체를 항기니피그 인슐린(1:200; Abcam, MA, USA) 및 토끼 항-PDX1(1:200; Abcam, MA, USA)과 함께 배양하였다. 1차 항체를 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 2차 형광 표지를 위해 세포를 항 기니피그 IgG Alexa Fluor 555(1:200; Abcam, MA, USA) 및 항 토끼 IgG Alexa Fluor 488(1:200; Thermo Fisher Scientific, MA, USA)과 함께 배양했다. 마지막으로 세포를 염색하고 ProLong gold antifade mountant(Life technologies, Maryland, USA)로 장착했다. 슬라이드는 EVOS® FL 자동 세포 이미징 시스템(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)에서 시각화되었다.

[0128]

그 결과, 췌장 관련 유전자 발현과 인슐린 분비를 분석하여 배양 조건에 따른 IPC 분화능을 비교하였다. 도 6a는 6, 10, 17일째에 분화 단계와 일치하는 췌장 내분비 마커(인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴), 외분비 마커(아밀라아제), 판 세포 마커(CK19) 및 췌장 전사 인자의 유전자 발현을 보여준다. iPSC에서 IPC로의 분화 유도는 또한 췌장 발달 과정에 존재하는 다른 관련 세포로의 분화를 유도한다. 췌장 관련 유전자 발현은 모든 배양 조건에서 분화와 함께 시간이 지남에 따라 점진적으로 증가하였다. NF 마이크로웰의 IPC 응집체는 췌장 발달에 중요한 전사 인자인 인슐린 및 PDX1의 가장 높은 발현을 나타냈다. 그러나, CK19 및 아밀라아제 발현은 NF 마이크

로웰에서 감소하였고, 이는 NF 마이크로웰을 사용한 응집체 형성이 분화된 iPSC를 내분비 세포로 유도할 수 있지만 원치 않는 외분비 및 덱트로의 트랜스-분화를 억제함을 시사하였다. PDX1, ISL1, NKX2.2 및 NGN3을 포함한 체장 특이적 전사 인자는 마이크로웰 배양에서 증가했다. 놀랍게도 MafA는 후기 단계에서 NF 마이크로웰에서만 발현되었고, NF 마이크로웰에서 가장 높은 수준의 GLUT2 발현이 관찰되었다. 유사하게, 인슐린 분비는 2D 배양 조건에 비해 3D 마이크로웰에서 크게 증가했다(도 6b).

실시예 5

[0130] IPC 응집체를 포함하는 투과성 NF 마이크로웰 어레이 멤브레인의 이식

[0131] <5-1> 당뇨병 누드 마우스에 NF 마이크로웰 어레이 막 내 IPC 응집체 이식

[0132] 동물 실험은 아산생명과학연구원 기관동물관리이용위원회(IACUC No. 2018-12-296)의 검토 및 승인을 받았다. 위원회는 ILAR(실험실 동물 자원 연구소) 지침을 준수한다. 처음에 10^6 개의 세포를 165개의 마이크로웰을 포함하는 맞춤형 12웰 삽입 벽과 통합된 NF 마이크로웰 배열 멤브레인에 접종했다. 동물 실험에서 두 개의 NF 마이크로웰 어레이 멤브레인을 각 이식 부위에 이식하였다. 즉, 각 동물에 2×10^6 개의 세포로 구성된 330개의 응집체를 이식하였다. 먼저, 세포 배양된 NF 마이크로웰 어레이 멤브레인을 삽입 프레임에서 멤브레인을 절단하여 수확했다. IPC 응집체를 갖는 막을 8주령 수컷 마우스의 간 표면, 피하 부위 및 복막 벽에 이식하였다. 간 표면 이식의 경우 이식 전에 마른 거즈/면봉으로 수용 부위의 표면을 긁어 유착을 유도했다. 멤브레인 부착을 향상시키기 위해 복막 벽에 유사한 상처를 부드럽게 만들었다. 표면 거칠기가 증가하였고 심한 출혈이나 파열이 일어나지 않도록 주의하여 이식하였다. 얇은 NF 막은 조직이나 장기 표면에 쉽게 이식되고 부착된다. 이식되지 않은 당뇨병 마우스를 음성 대조군으로 사용하였다. 또한 2000 IEQ의 인간 섬을 양성 대조군으로 사용하기 위해 신장 캡슐에 이식했다. 이식 후 인간 인슐린 분비를 확인하기 위해 이식된 IPC에서 인간 C-펩티드를 초민감성 인간 C-펩티드 ELISA 키트(Mercodia, Sweden)를 사용하여 평가하였다.

[0134] <5-2> 조직학적 분석

[0135] 60일째에 마우스를 희생시킨 후, 채취한 조직을 4℃에서 24시간 동안 10% 포르말린 용액에 고정시켰다. 고정된 조직으로 파라핀 블록을 준비하고 4μm 섹션으로 잘랐다. 샘플을 탈파라핀화하고, 탈수하고, 헤마톡실린 및 에오신(Sigma Aldrich)으로 염색하였다. 토끼 항-PDX1 및 토끼 항-인슐린(희석 1:200, Abcam, Cambridge, UK)의 1차 항체를 사용하여 면역조직화학을 수행하였다. 섹션(4μm 두께)을 탈파라핀화하고, 등급 알코올 시리즈를 통해 탈수하고, 과산화수소로 차단하고, 실온에서 10분 동안, 65℃의 인큐베이터에서 20분 동안 건조했다. 면역조직 화학에는 OptiView DAB 감지 키트(Ventana Medical Systems)가 포함된 자동 슬라이드 준비 시스템(Benchmark XT; Ventana Medical Systems Inc, Tucson, AZ, USA)이 사용되었다.

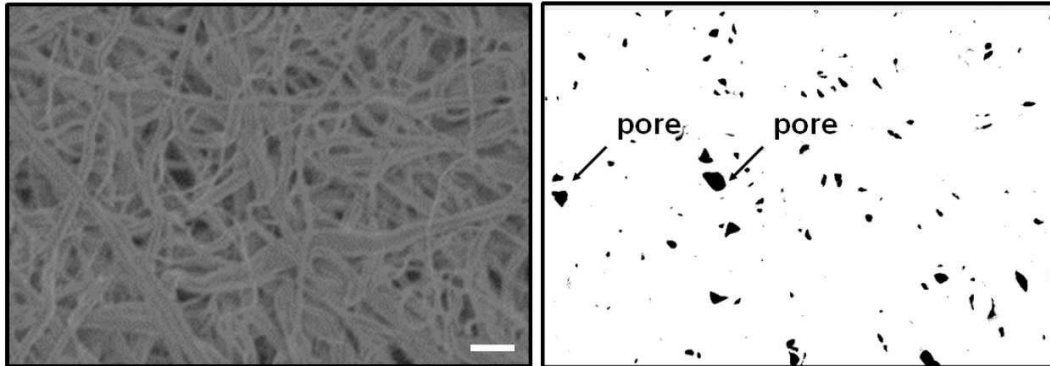
[0136] 그 결과, 얇은 NF 막은 봉합이나 고정 없이 피하 부위, 복막벽 및 간 표면을 포함한 다양한 기관에 부착되었다(도 7b, 0일째 사진). NF 마이크로웰의 IPC 응집체가 이식 2개월 후에 주변 조직과 접촉 및 통합된 것으로 밝혀졌다(도 7b, 60일째 사진). 복막의 매끄러운 표면이나 간 표면에 대한 접착력은 약간의 흡집을 통해 향상될 수 있다. 조직학적 평가를 통해 마이크로웰에 이식된 IPC 응집체가 잘 생존하고 PDX1과 인슐린을 발현함을 확인하였다. 흥미롭게도 이식된 세포의 재배열과 혈관 형성은 이식 부위에 따라 달랐다. 이식된 세포에서 인슐린 분비를 확인하기 위해 혈장에서 인간 C-펩타이드를 확인했다. 생체 내에서 점차적으로 세포 분화가 유도됨에 따라 1개월보다 2개월에 더 높은 C-펩타이드 분비가 확인되었으나, 본 연구에서는 이식 부위에 따른 유의한 차이는 없었다. 인간 c-펩티드는 세포가 이식되지 않은 마우스에서 검출되지 않았다. 비교를 위해 2000개의 IEQ 인간 섬을 신장 캡슐에 이식했으며 이 그룹에서 약 900pg/mL의 인간 C-펩타이드가 검출되었다(도 7c).

[0138] [통계분석]

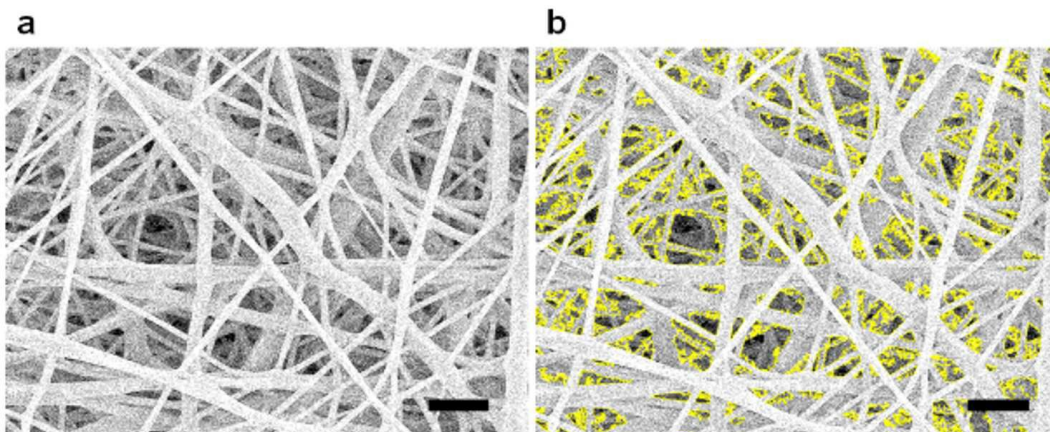
[0139] 데이터는 평균 ± 평균의 표준 편차(SD)로 표시된다. 쌍을 이루는 2-꼬리 t-검정이 두 그룹을 비교하기 위해 적용되었다. Tukey 다중 비교 테스트를 사용한 ANOVA는 2개 이상의 그룹을 비교하는데 사용되었다. p-값<0.05는 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다.

도면

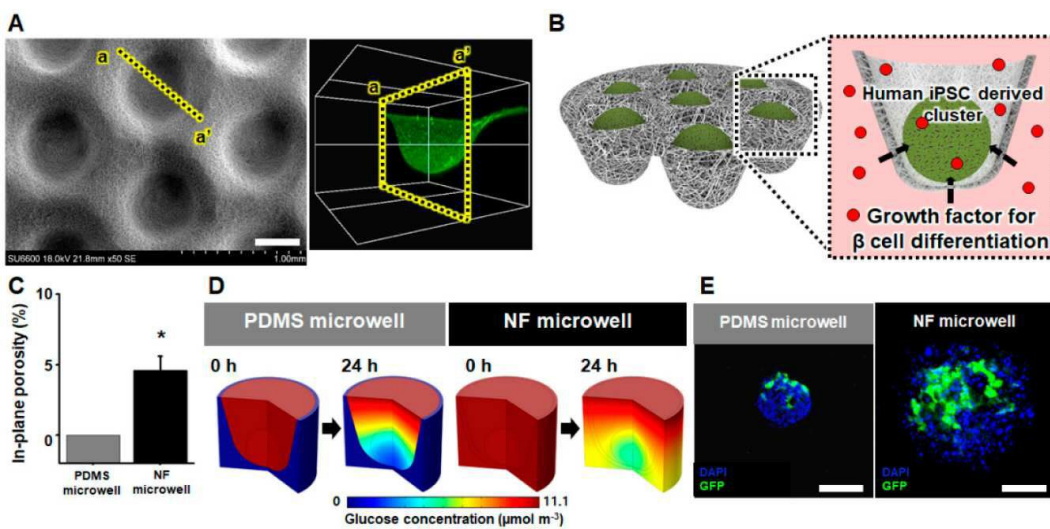
도면1a



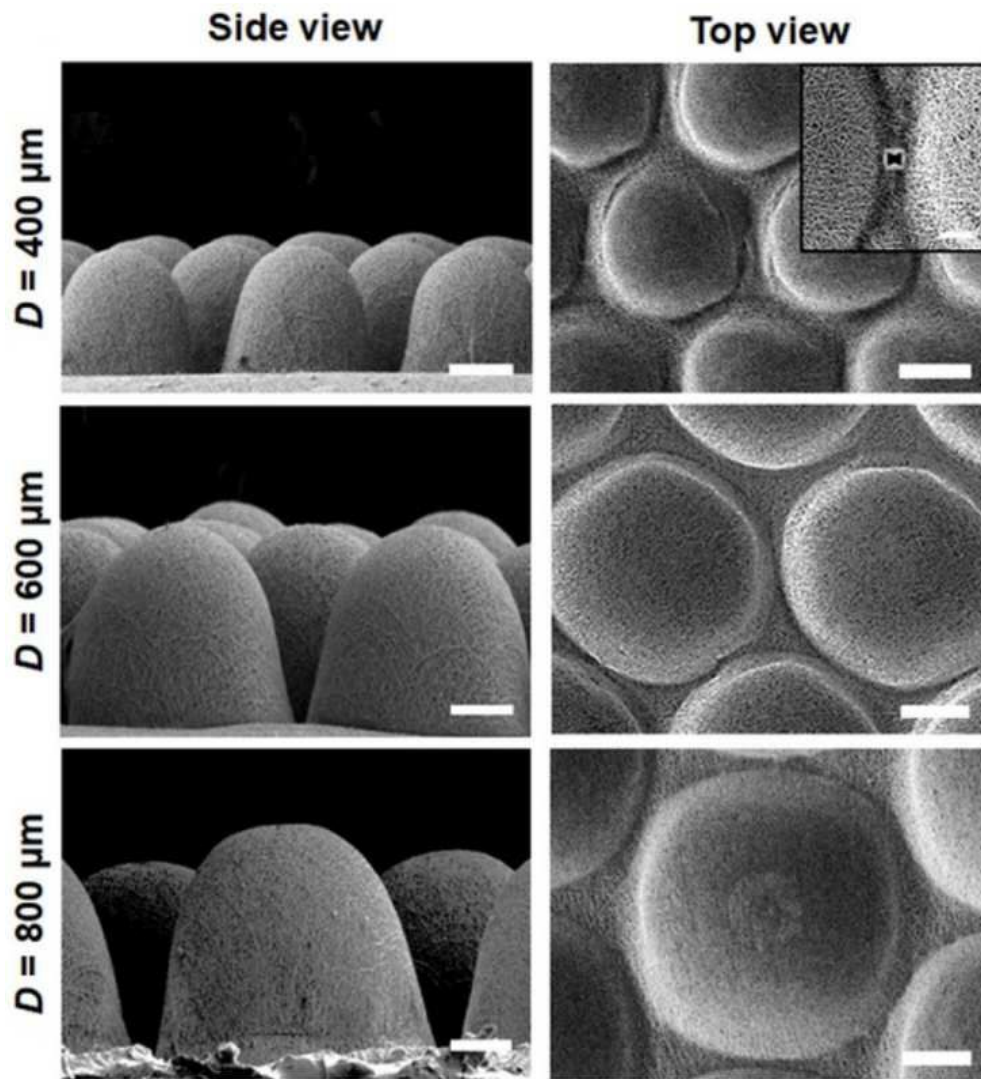
도면1b



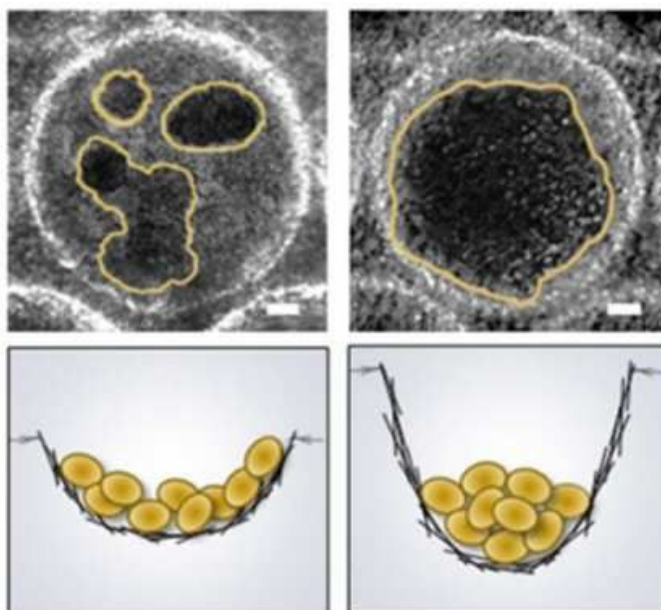
도면2



도면3a



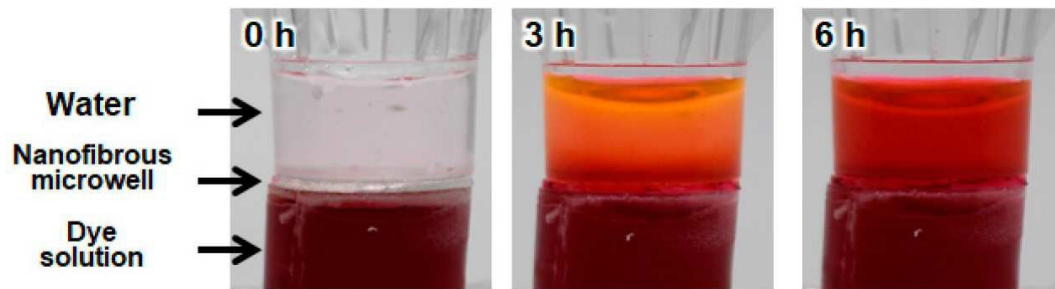
도면3b



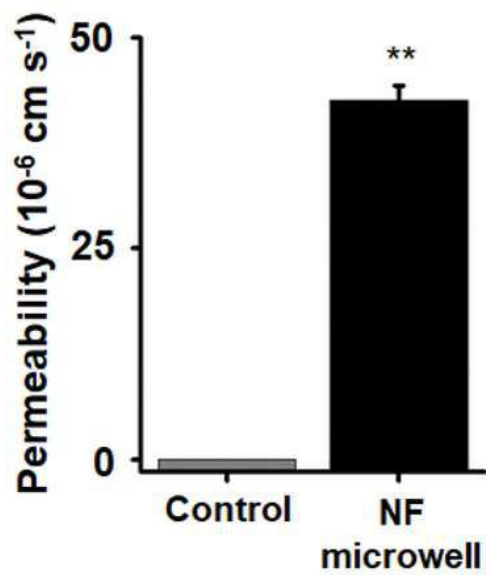
도면3c



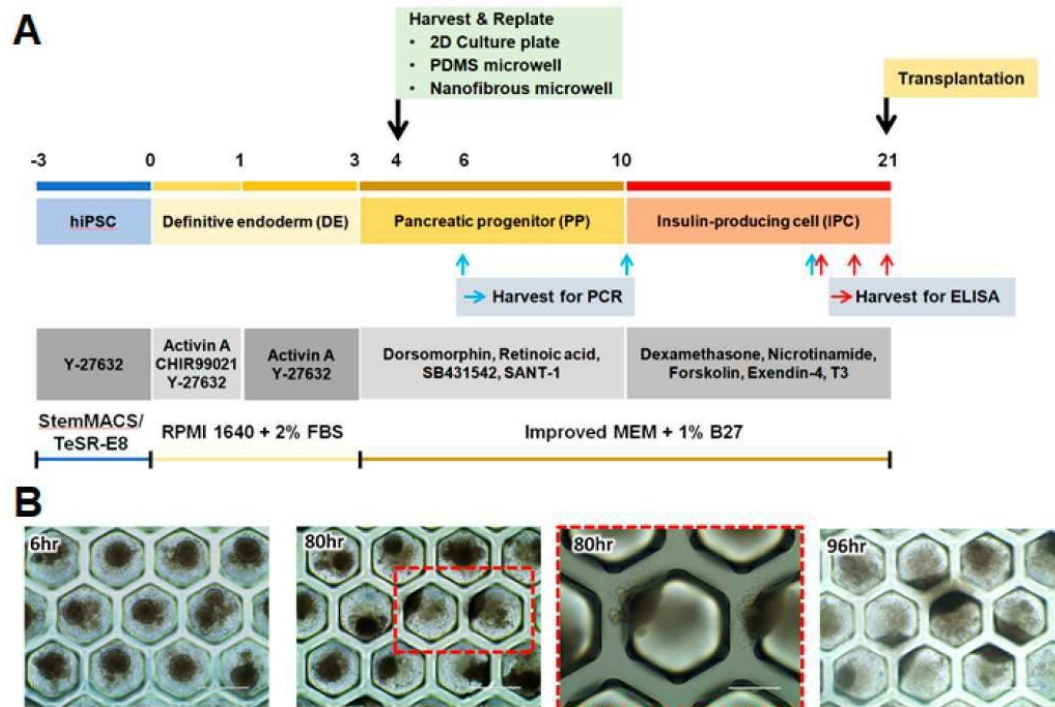
도면4a



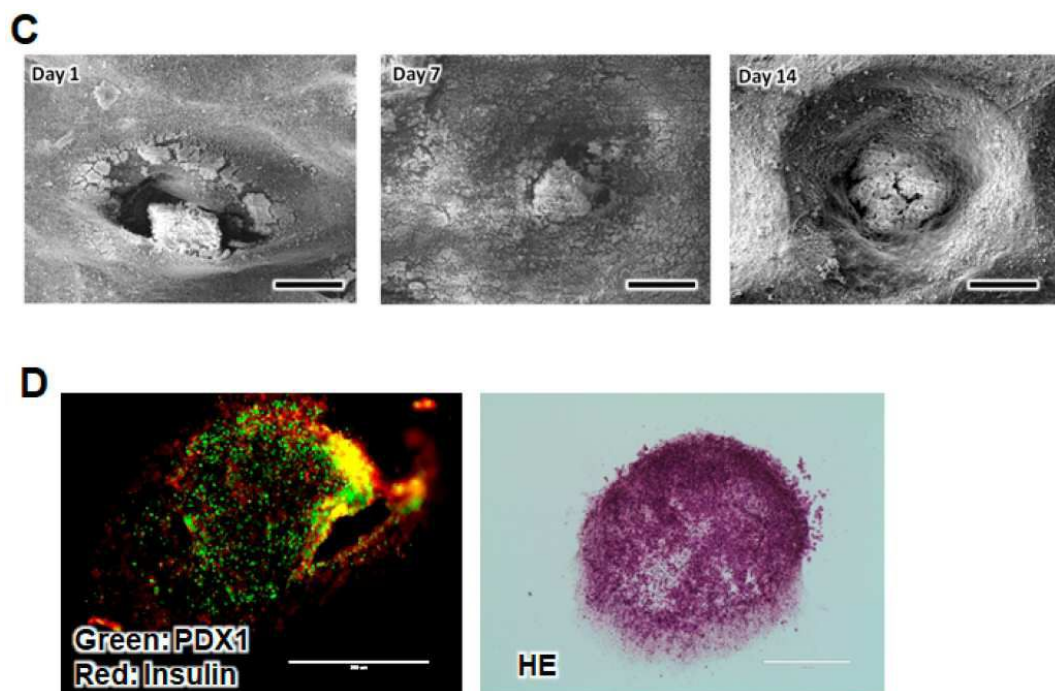
도면4b



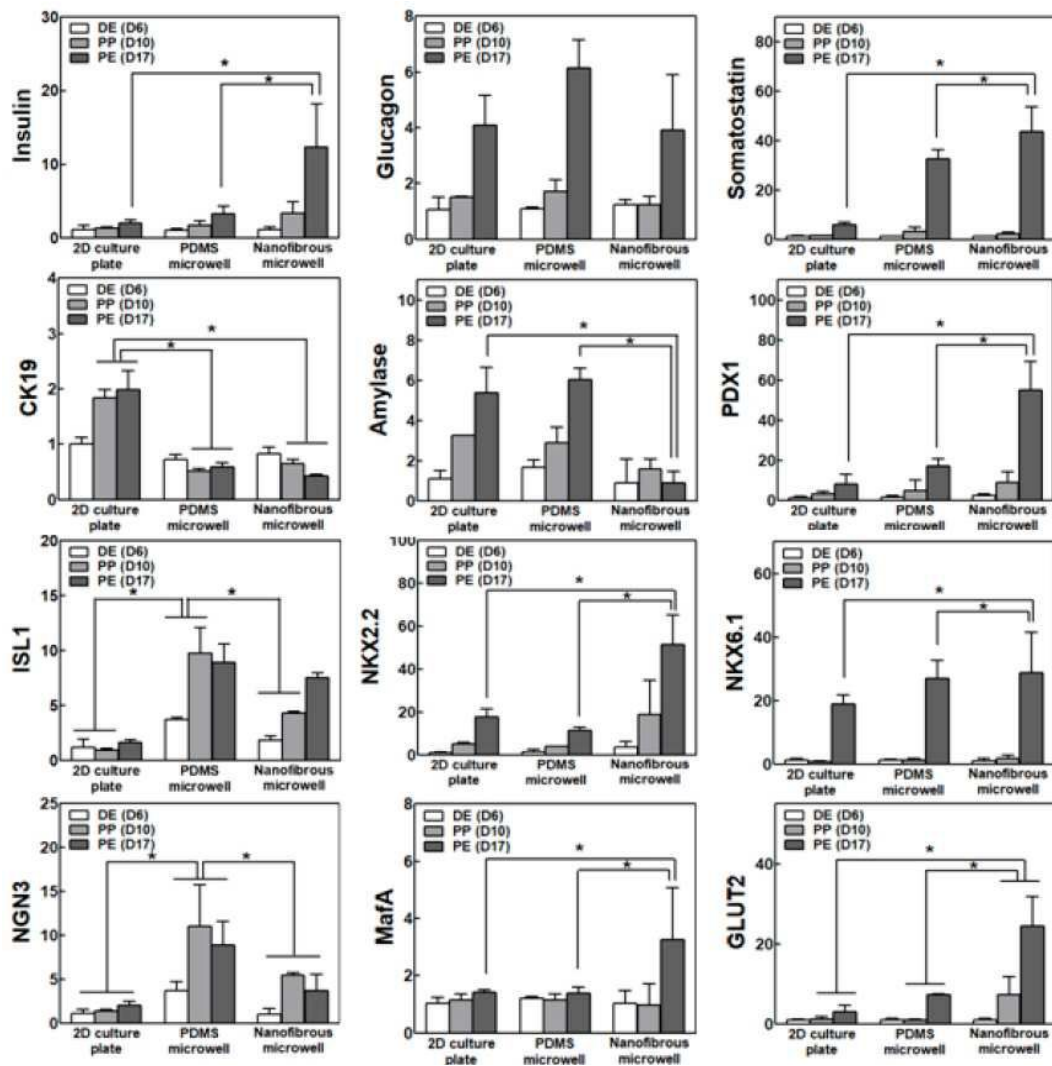
도면5a



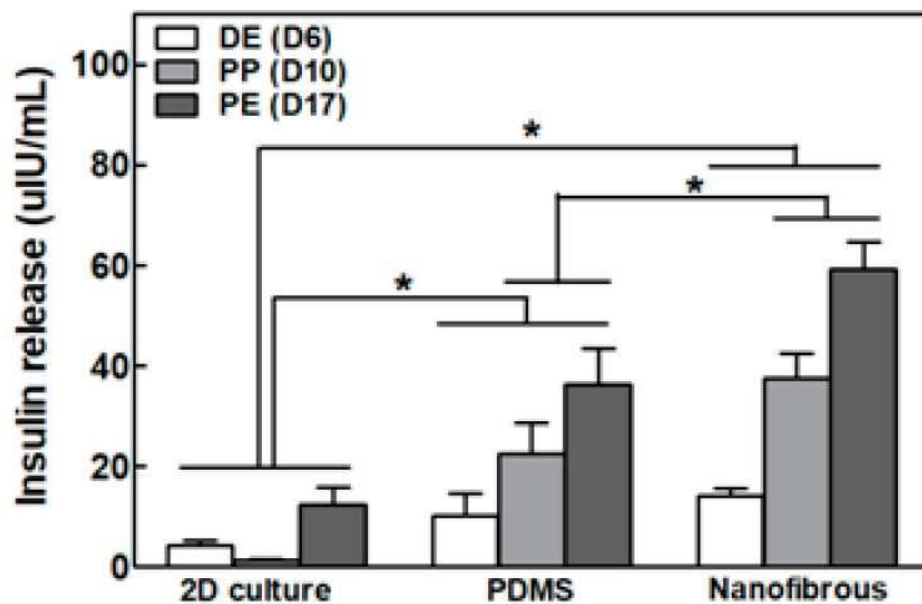
도면5b



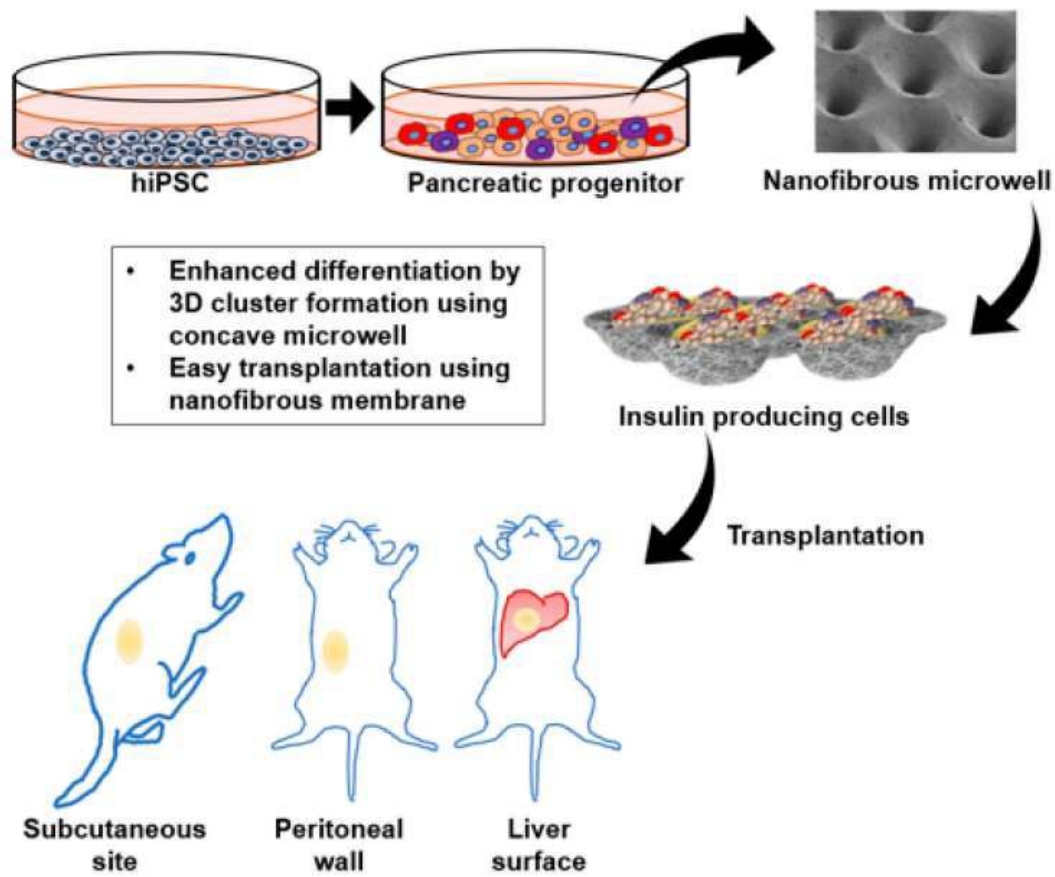
도면6a



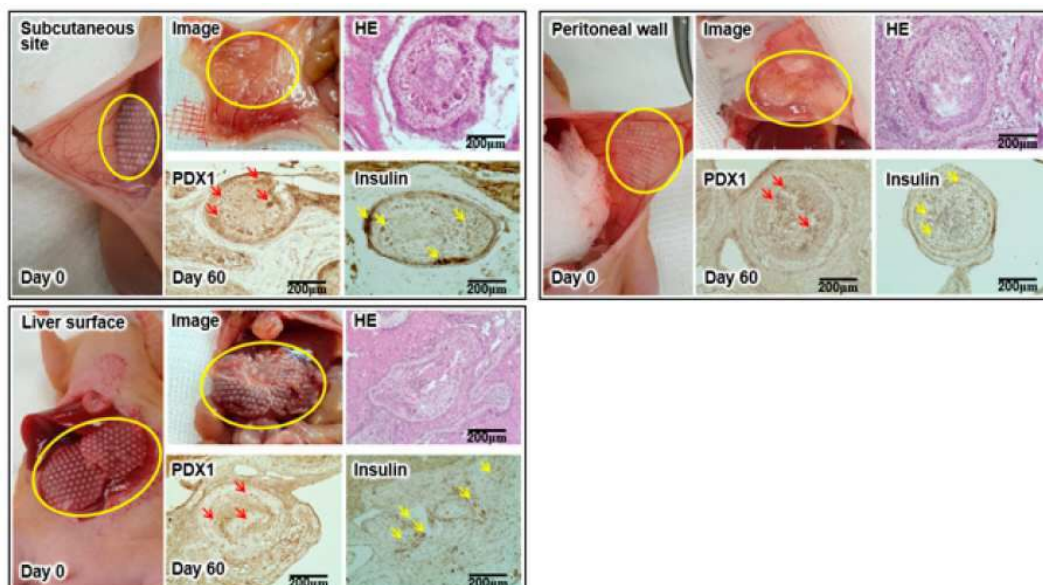
도면6b



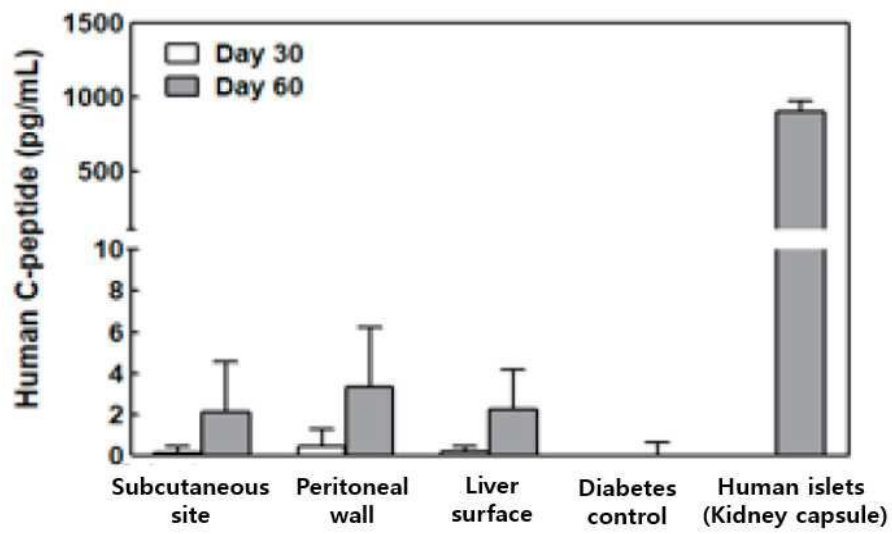
도면7a



도면7b



도면7c



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.